

Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Mul-Arg

Serge PUJARNISCLE

Laboratoire de Physiologie Végétale, O.R.S.T.O.M. Centre d'Adiopodoumé,
B.P. 20 Abidjan (Côte d'Ivoire)

(Manuscrit reçu le 29 septembre 1967)

RÉSUMÉ

Les lutoïdes du latex d'*Hevea* ont été étudiés après séparation par centrifugation différentielle et isopycnique.

Ces particules contiennent plusieurs hydrolases ayant leur optimum d'activité à environ pH 3,6 pour la cathepsine; pH 5,0 pour la phosphatase acide et la β -N-acétyl-glucosaminidase; pH 5,5 pour la β -galactosidase et la ribonucléase acide; pH 6,0 pour la phosphodiesterase et la désoxyribonucléase acide et pH 7,0 pour la β -glucosidase.

Ces activités hydrolytiques sont sous forme latente dans les lutoïdes. Elles peuvent être révélées par des préincubations de ces particules à pH 5,0 et à 30 °C, par des traitements avec des solutions de détergents non-ioniques ou par leur exposition dans des milieux hypotoniques. On en conclut que les lutoïdes sont des organites appartenant au groupe des lysosomes et certaines hypothèses sont avancées concernant les relations possibles entre la stabilité des lutoïdes et la productivité de l'*Hevea brasiliensis*.

SUMMARY

Lutoïds particles of Hevea latex were investigated after separation by differential and isopycnic centrifugation.

These particles contain various hydrolases showing optimum activity at about pH 3,6 for cathepsin; pH 5,0 for acid phosphatase and β -N-acetyl-glucosaminidase; pH 5,5 for β -galactosidase and acid ribonuclease; pH 6,0 for phosphodiesterase and acid deoxyribonuclease and pH 7,0 for β -glucosidase.

The hydrolases activities of lutoïds occur in latent form. This latence can be suppressed by preincubations of the particles at pH 5,0 and at 30 °C; by exposure into solutions of non-ionic detergents or by osmotic shocks.

These results can bring to the conclusion that the lutoïds particles are the lysosomes equivalent of latex.

The possible role of the lutoïds stability and the productivity of Hevea brasiliensis is discussed.

INTRODUCTION

Le latex d'*Hevea brasiliensis* tel qu'il est obtenu après la saignée de l'arbre est une suspension de diverses particules dans un sérum aqueux. Pendant longtemps il a été considéré comme d'origine vacuolaire consistant en métabolites en solution ou en suspension. Cependant avec l'avancement des travaux et des observations

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

5 AVRIL 1968

n° 72152

acquises ces dix dernières années, ce point de vue a dû être peu à peu abandonné et on a été amené à admettre sa nature cytoplasmique (COCKBAIN et SOUTHORN, 1962).

Si le latex est composé principalement de particules de caoutchouc représentant 20 à 40 % du poids du latex frais, on y trouve aussi des enzymes capables de synthétiser *in vitro* le caoutchouc à partir d'acétate (BANDURSKI et TEAS, 1957), des noyaux, des mitochondries et des ribosomes (ARCHER et McMULLEN, 1960; DICKENSON, 1964). En outre, il y existe aussi des organites qui semblent être propres à la cellule laticifère. Parmi ceux-ci on peut citer les particules de Frey-Wyssling (FREY-WYSSLING, 1929), granules jaunes riches en lipides et caroténoïdes, et les lutoïdes, de taille très supérieure aux particules de caoutchouc, qui ont été isolés et décrits par HOMANS et VAN GILS (1948).

Les lutoïdes, qui font l'objet de cette présente étude, sont après le caoutchouc les éléments les plus abondants du latex. Divers auteurs en ont étudié les aspects morphologiques tant au microscope optique (RUINEN, 1950; SOUTHORN, 1960) qu'au microscope électronique (ANDREWS et DICKENSON, 1960; DICKENSON, 1964).

Ce sont des corps fluides, ayant un diamètre pouvant varier de 2 à 10 μ , limités par une membrane simple contenant de petites inclusions. Etant donné leur taille, ils sédimentent facilement par centrifugation à basse vitesse et constituent la majeure partie de ce que l'on appelle communément la « fraction jaune » du latex. En fait, la coloration de cette fraction est due aux particules de Frey-Wyssling entraînées pendant la centrifugation.

Du point de vue biologique, la fonction des lutoïdes au sein de la cellule laticifère reste encore très obscuré et il a été suggéré qu'ils représentent des vacuoles polydispersées car ils absorbent les colorants vacuolaires comme le rouge neutre (RUINEN, 1950).

Dans la fraction lutoïde obtenue par centrifugation du latex, ARCHER et *al.* (1963) ont observé la présence d'une phosphatase susceptible d'hydrolyser l'isopen-tenyl pyrophosphate en isopentenol. Des études faites à l'aide de techniques biochimiques et cytochimiques ont montré que la phosphatase qui est du type acide avec une activité maximum à pH 5,0 environ (PUJARNISCLE, 1965) est bien localisée dans les lutoïdes (PUJARNISCLE et RIBAILLIER, 1966). En outre, toujours dans la fraction lutoïde séparée du latex par centrifugation, d'autres hydrolases ont pu être caractérisées (PUJARNISCLE, 1966).

Ces divers résultats amènent tout naturellement à penser qu'il doit exister une certaine analogie entre les lutoïdes et les lysosomes décrits par DE DUVE (1959) dans la cellule animale.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. — CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE

Le latex obtenu lors de la saignée d'un arbre est recueilli dans un récipient refroidi par de la glace fondante.

Vingt ml de ce latex sont dilués quatre fois avec une solution tampon isotonique (mannitol 0,3 M + Tris-CIH 0,02 M de pH 7,3) et le mélange est centrifugé dans le rotor 50 de la centrifugeuse Spinco modèle L-2-50 pendant 10 mn à 10 000 tr/mn (g moyen = 6 600).

Le surnageant formé du caoutchouc et du sérum est mis de côté alors que le sédiment constitué principalement de lutoïdes est resuspendu dans le mannitol-Tris à l'aide d'un homogénéiseur

de Potter manié à la main. Cette suspension est centrifugée pendant 10 mn à 5 000 tr/mn (g moyen = 1 650).

Le sédiment obtenu, remis en suspension dans le mannitol-Tris, est complété à 20 ml et constitue la fraction lutoïde pratiquement débarrassée de caoutchouc.

Les surnageants des deux centrifugations sont mélangés et complétés à 150 ml avec le mannitol-Tris.

II. — CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

Le gradient linéaire de densité allant de 1,18 à 1,01 environ est obtenu par mélange progressif de deux solutions de mannitol 0,3 M dont l'une contient du saccharose à 50 %.

Sur ce gradient on étale, soit 1 ml de suspension de lutoïdes, soit 1 ml de latex qui a été au préalable dilué avec du mannitol 0,3 M. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 2 h à 39 000 tr/mn (g moyen = 124 000) dans le rotor SW 39.

Après percement du fond du tube, des fractions de 5 gouttes sont recueillies et amenées à un volume donné avec du tampon cacodylate 5 mM de pH 7,0.

La densité de chacune de ces fractions est calculée à partir de leur indice de réfraction mesuré au réfractomètre.

III. — DOSAGE DES ENZYMES HYDROLYTIQUES

a) Activités mesurées à l'aide de substrats synthétiques au p-nitrophénol

— *Phosphatase acide* (E.C.3.1.3.2.) : Elle est dosée en milieu tampon acétate 0,1 M à pH 5,0 avec 10 μ M/ml de p-nitrophényl phosphate comme substrat (LINHARDT et WALTER, 1963).

— β -*Glucosidase* (E.C.3.2.1.21) : Elle est dosée à pH 7,0 en milieu tampon phosphate 0,1 M avec 4 μ M/ml de p-nitro-phényl- β -D-galactopyranoside comme substrat (CONCHIE et LEVY, 1957).

— β -*Galactosidase* (E.C.3.2.1.23) : Elle est dosée à pH 5,5 en milieu tampon phosphate-citrate 0,1 M avec 10 μ M/ml de p-nitro-phényl- β -D-galactopyranoside comme substrat (CONCHIE et LEVY, 1957).

— β -*N-Acétyle-glucosaminidase* (E.C.3.2.1.30) : Elle est dosée à pH 5,0 en milieu tampon citrate 0,1 M avec 2 μ M/ml de p-nitro-phényl-2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranoside comme substrat (CONCHIE et LEVY, 1957).

— *Phosphodiesterase* (E.C.3.1.4.1.). Cet enzyme présente deux activités maximales, l'une à pH 6,0, l'autre à pH 8,0 (cf. fig. 1). Les dosages ont été faits à pH 6,0 en milieu tampon cacodylate 0,1 M avec 10 μ M/ml de bis (p-nitro-phényl) phosphate de sodium (SINSHEIMER et KERNER, 1952). A ce pH, l'activité phosphatase acide est encore très élevée, de deux à cinq fois plus active que la phosphodiesterase. On peut donc penser *a priori* que tout le p-nitro-phényl-phosphate libéré par la phosphodiesterase est hydrolysé par la phosphatase. Dans ces conditions on a divisé par deux la quantité de p-nitrophénol libérée lors de la réaction pour obtenir l'activité réelle de la phosphodiesterase.

Pour tous ces dosages, le volume réactionnel est de 2 ml. Les incubations se font à 30 °C pendant 10 mn pour la phosphatase et la β -glucosidase. Dans le cas de la phosphodiesterase, la β -galactosidase et la β -N-acétyle-glucosaminidase dont les activités sont faibles, les incubations sont de 30 mn à 30 °C.

La réaction est bloquée par addition de 2 ml d'acide trichloracétique N et le mélange est filtré.

A 2 ml de filtrat, on additionne 1 ml de NaOH N et 2 ml de tampon glycine- CO_2Na_2 0,15 M de pH 10. La coloration développée par le p-nitrophénol est mesurée au colorimètre Klett-Sumerson muni du filtre violet n° 42, ou au spectrophotomètre Beckman modèle D.B., à 400 m μ .

b) Activités mesurées à l'aide de substrats naturels

— *Cathepsine* : Elle est dosée selon le principe de DE DUVE et al. (1955) en milieu tampon acétate 0,2 M de pH 3,6 avec 16,5 mg/ml d'hémoglobine de Bœuf comme substrat. Le volume

réactionnel est de 4 ml et les incubations se font à 30 °C pendant 1 à 3 h selon l'activité de la suspension utilisée (1 h pour le latex et les lutoïdes ; 3 h pour le surnageant). La réaction est bloquée par addition de 5 ml d'acide trichloracétique à 10 %. Le mélange est abandonné pendant 30 mn à température ambiante puis filtré sur filtre lent. 5 ml de filtrat sont mélangés à 5 ml de CO_2Na_2 à 14 % et on additionne ensuite 3 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3. La lecture se fait au bout de 20 mn au colorimètre Kett-Sumerson muni du filtre n° 69.

— *Ribonucléase acide* (E.C.2.7.7.17) : Elle est dosée selon le principe de DE DUVE et *al.* (1955) dans un volume total de 2 ml contenant du tampon citrate 0,1 M de pH 5,5 et de l'acide ribonucléique hautement polymérisé à la concentration de 1,25 mg/ml. Après 5 h d'incubation à 30 °C, la réaction est bloquée par addition de 2 ml d'acide trichloracétique à 5 % contenant 1,5 % de $(\text{SO}_4)_3\text{Al}_2$, 8 H_2O . Le mélange est abandonné pendant 30 mn à 0 °C puis filtré sur filtre lent. Une aliquote du filtrat est diluée avec de l'eau et la densité optique est mesurée à 260 μm au spectrophotomètre Beckman modèle D.B.

— *Désoxyribonucléase acide* (E.C.3.1.4.6.) : Elle est dosée selon le principe de DE DUVE et *al.* (1955) dans un volume total de 2 ml contenant du tampon cacodylate 0,1 M de pH 6,0 et 1 mg/ml d'acide désoxyribonucléique hautement polymérisé. Après 5 h d'incubation à 30 °C, la réaction est bloquée par addition de 2 ml d'acide perchlorique à 10 % (p/v) et le mélange est abandonné pendant 30 mn à 0 °C, puis filtré sur filtre lent. Une aliquote du filtrat est diluée avec de l'eau et la densité optique est mesurée à 260 μm au spectrophotomètre Beckman modèle D.B.

En ce qui concerne la ribonucléase et la désoxyribonucléase, il n'a pas été possible de mesurer leurs activités dans le latex. Les mesures n'ont été faites que sur les lutoïdes et les fractions obtenues par centrifugation isopycnique.

Dans tous les dosages, il a été fait des témoins appropriés contenant tous les réactifs, sauf l'homogénat qui a été ajouté après coagulation, et les valeurs obtenues ont été soustraites de celles mesurées dans les conditions normales.

Les activités dosées à l'aide de substrats synthétiques se font en double avec un témoin ; celles mesurées à l'aide de substrats naturels se font en triple avec deux témoins.

Toutes les hydrolases ont été mesurées au pH optimum et avec la quantité de substrat correspondant à la saturation de l'enzyme. Les méthodes ont été vérifiées et, dans nos conditions opératoires, il y a proportionnalité entre l'activité et la concentration en lutoïdes ou la durée d'incubation.

En ce qui concerne les mesures effectuées sur les fractions obtenues par centrifugation isopycnique, les durées d'incubation ont dû être augmentées et vont de 1 à 48 h selon l'activité de l'enzyme étudié. Pour éviter les contaminations bactériennes, les milieux ont été additionnés de thio-mersalate à une concentration finale de 0,01 % (BEAUFAY et *al.*, 1964).

IV. — DOSAGE DES PROTÉINES

Dans la plupart des cas, les protéines ont été dosées sous forme d'azote insoluble dans l'acide trichloracétique N. L'insoluble est filtré sur filtre lent de 30 mm de diamètre et lavé trois fois avec de l'acide trichloracétique N. Le papier filtre contenant le caoutchouc et les protéines est minéralisé avec de l'acide sulfurique concentré. L'azote est ensuite dosé colorimétriquement par la méthode de Nessler (UMBREIT, BURRIS et STAUFFER, 1957). En outre, on mesure l'interférence apportée par le papier en minéralisant des filtres de même type. Cette interférence est d'ailleurs très faible, de l'ordre de 5 % de l'azote mesuré.

En ce qui concerne les fractions obtenues après centrifugation isopycnique, les protéines ont été dosées selon LOWRY et *al.* (1951) avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

V. — PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

a) Activité libre et activité totale

Quand cela a été possible, dans le cas d'enzymes très actifs, l'activité libre a été mesurée en milieu mannitol 0,3 M avec des durées d'incubation courtes de l'ordre de 10 mn (DE DUVE et *al.*, 1955). Dans les autres cas, on a mesuré les activités totales en présence de 0,1 % de Triton X-114 (WATTIAUX et DE DUVE, 1956) détergent non ionique qui provoque la lyse des lutoïdes et la libération sous forme soluble de leurs enzymes.

b) Expression des activités enzymatiques

Dans les dosages faisant appel aux substrats synthétiques à base de p-nitro-phénol (phosphatase, phosphodiesterase, β -glucosidase, β -galactosidase et β -N-acétyl-glucosaminidase), les activités sont exprimées en μ M de p-nitrophénol libérées en une minute.

Dans le cas de la cathepsine, l'activité a été exprimée conventionnellement en μ M d'équivalent tyrosine libérée en une minute.

Dans le cas de la ribonucléase et de la désoxyribonucléase, les activités sont exprimées en μ M d'oligonucléotide soluble libérée en une minute, en supposant que leur coefficient d'extinction moyen est de $8,5 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$ à 260 m μ (DE DUVE et *al.*, 1955).

VI. — MATÉRIEL UTILISÉ

Les latex utilisés dans cette étude proviennent d'Hévéas issus de graines clonales (TJ1 illégitime) et d'Hévéas greffés (clone GT1) de la station expérimentale de l'Institut des Recherches sur le Caoutchouc en Afrique (I.R.C.A.) de Bimbresso (Côte d'Ivoire).

Le p-nitrophényl-phosphate et le bis (p-nitrophényl) phosphate de sodium, les p-nitrophényl- β -D-glucopyranoside, β -D-galactopyranoside, -2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranoside proviennent de Koch-Light laboratories (Angleterre), ainsi que l'acide désoxyribonucléique hautement polymérisé de Thymus, et l'hémoglobine de Bœuf. L'acide ribonucléique hautement polymérisé de Levure provient de Calbiochem (U.S.A.), et le thiomersalate de Hopkin and Williams (Angleterre).

RÉSULTATS

I. — ACTION DU pH SUR L'ACTIVITÉ DES ENZYMES

La figure 1 illustre les activités des huit hydrolases (phosphatase, phosphodiesterase, β -glucosidase, β -galactosidase, β -N-acétyl-glucosaminidase, cathepsine, ribonucléase et désoxyribonucléase) mesurées dans la fraction lutoïde obtenue par centrifugation du latex.

A part la β -glucosidase qui présente un maximum d'activité à pH 7,0 et la phosphodiesterase qui a deux maximum, l'un à pH 6,0, l'autre à pH 8,0, les autres hydrolases ont toutes leur activité optimale à des pH acides.

La cathepsine a son maximum à un pH très acide (3,6) alors que pour les autres hydrolases, leur maximum se situe à des pH compris entre 3 et 6 : pH 5,0 pour la phosphatase et la β -N-acétyl-glucosaminidase ; pH 5,5 pour la β -galactosidase et la ribonucléase et pH 6,0 pour la désoxyribonucléase.

II. — RÉVÉLATION DES HYDROLASES « LUTOÏDIQUES »

Une des particularités des lysosomes est que leurs hydrolases sont normalement enfermées dans la particule et de ce fait réagissent peu ou pas sur les substrats en solution dans le milieu qui les entoure. Néanmoins l'activité de ces enzymes peut être facilement révélée par des traitements provoquant la rupture de la membrane de la particule ce qui a pour effet de libérer les enzymes qui passent en solution et deviennent alors pleinement actifs.

C'est effectivement ce qui se passe avec les lutoïdes lorsque la phosphatase acide est prise comme enzyme caractéristique de cette particule. Normalement peu

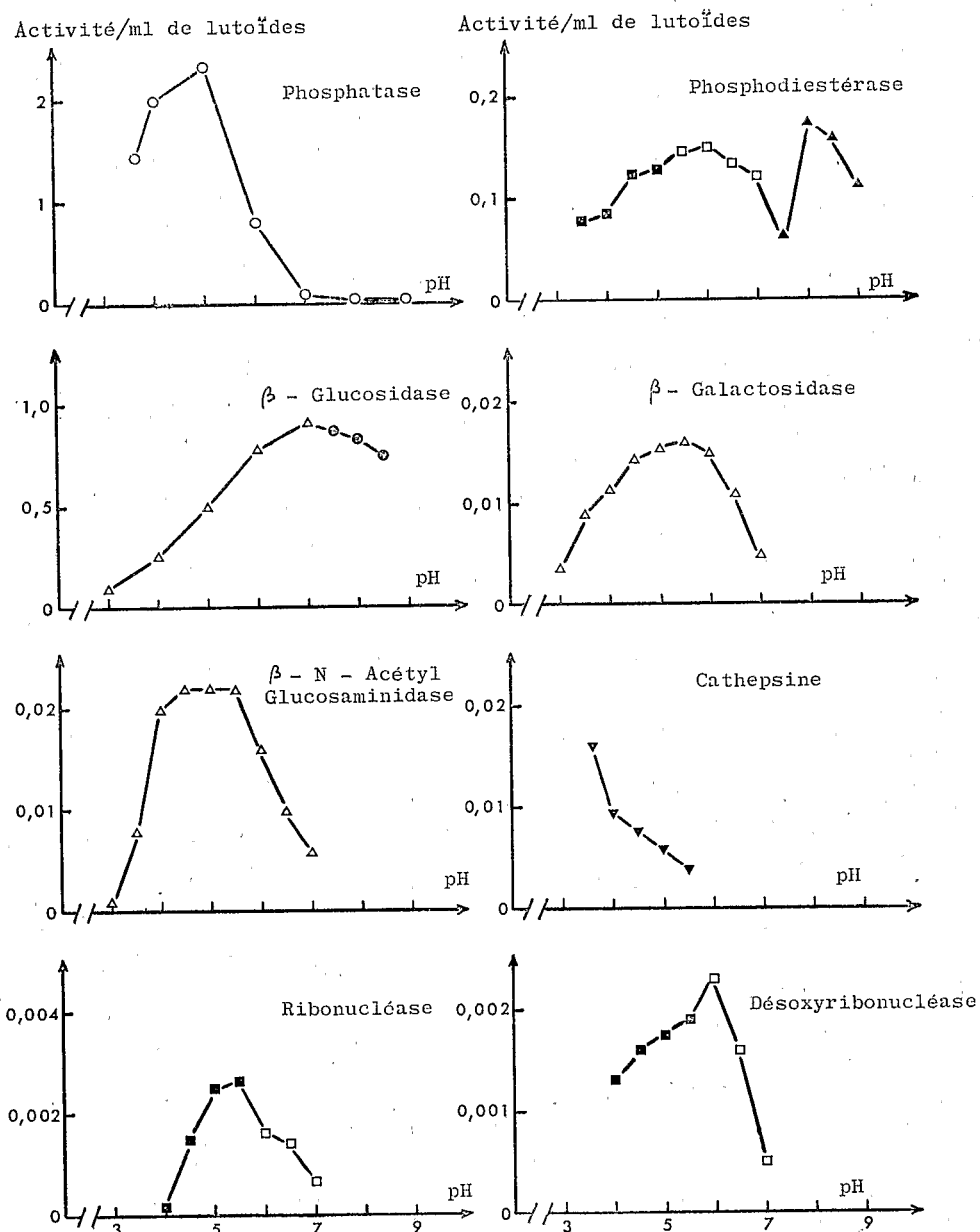


FIG. 1. — Action du pH sur l'activité des enzymes hydrolytiques des lutoïdes. Les incubations ont été faites en milieu tampon acétate-borate-cacodylate 0,1 M (○); citrate 0,1 M (■); cacodylate 0,1 M (□); Tris-ClH 0,1 M (▲); phosphate-citrate 0,1 M (Δ); phosphate 0,1 M (●); acétate 0,2 M (▼).

importante dans le latex ou la fraction lutoïde, elle est facilement activée par des traitements lysant la membrane de la particule, comme l'action du Triton-X-114, de solutions hypotoniques, ou de préincubations à pH 5,0 et à 30 °C.

a) Action du triton X-114

Il a déjà été montré par WATTIAUX et DE DUVE (1956) que les détergents non-ioniques à activité hémolytique provoquent la lyse des particules. Dans le cas des lutoïdes, le Triton X-114 a un effet analogue et la figure 2 illustre son action sur la libération de la phosphatase acide à partir de la fraction lutoïde obtenue par centrifugation du latex.

Au-delà de 0,025 % de Triton X-114, l'activité phosphatase reste constante et est égale à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton. Cette concentration de 0,1 % est donc largement suffisante pour provoquer la lyse totale des lutoïdes et n'a aucun effet inhibiteur sur la phosphatase acide.

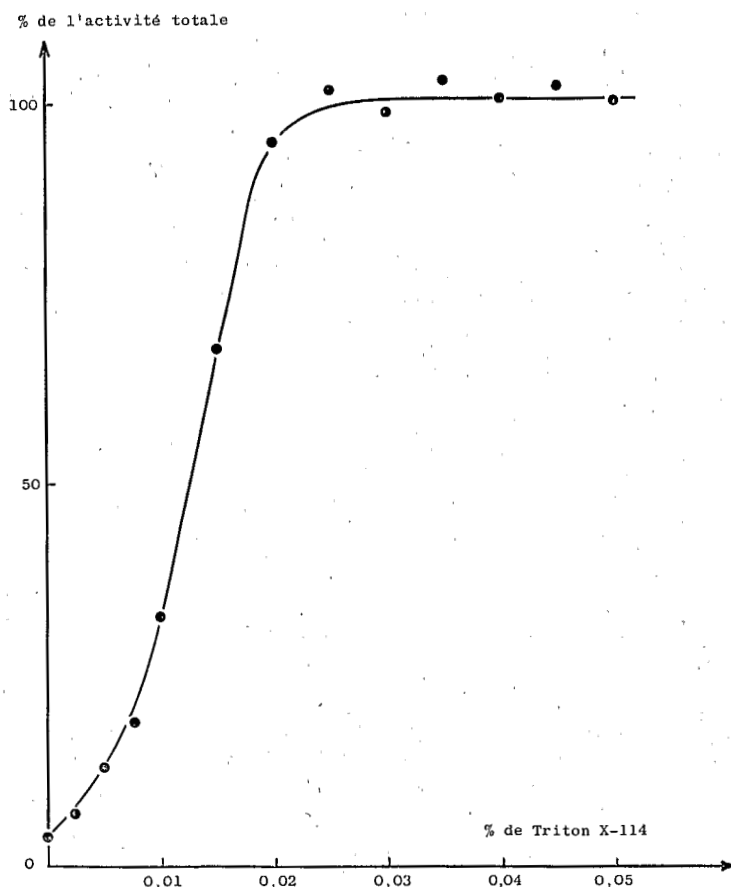


FIG. 2. — Action du Triton X-114 sur la phosphatase acide des lutoïdes. Les incubations ont été faites en milieu mannitol 0,3 M et en présence de quantités croissantes de Triton X-114. Les résultats sont donnés en pourcentage de l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114. (Moyenne de 3 expériences).

b) Action de la pression osmotique du milieu

Comme tout système osmotique particulière, les lutoïdes sont sensibles à leur environnement. Les milieux hypertoniques et surtout hypotoniques provoquent des perturbations dans la structure de la particule et il s'en suit une libération plus ou moins prononcée de leurs enzymes, en l'occurrence de la phosphatase acide comme l'indique la figure 3.

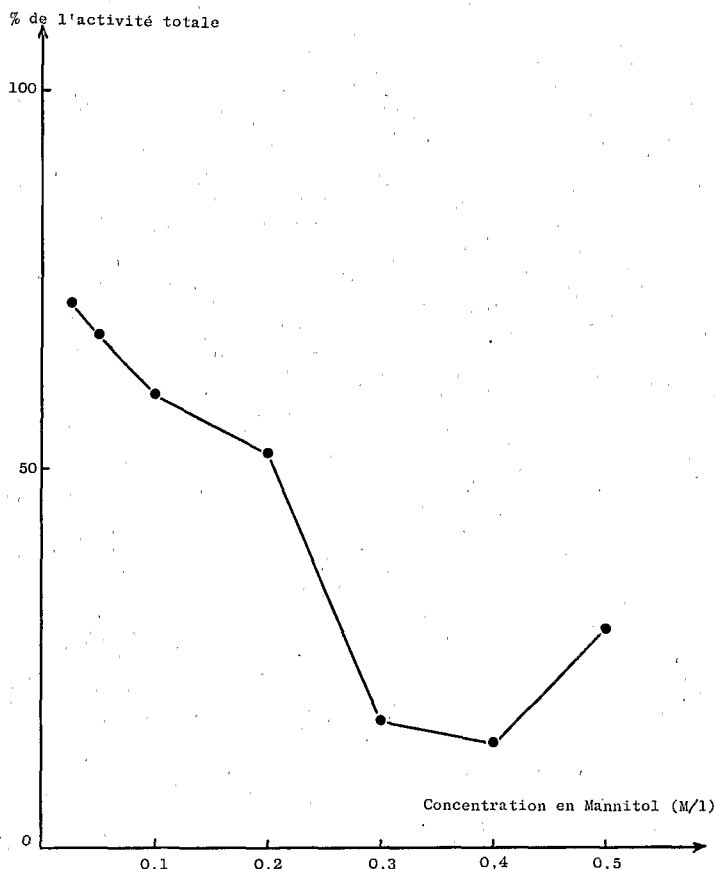


FIG. 3. — Effet de la tonicité du milieu sur la libération de la phosphatase acide des lutoïdes. Les lutoïdes ont été placés dans des milieux de concentration variable en mannitol et abandonnés 15 mn à 0 °C. La phosphatase a ensuite été dosée comme d'habitude, le milieu ayant été ramené à une concentration de 0,3 M en mannitol. (Moyenne de 3 expériences).

L'activité libre de la phosphatase acide passe par un minimum pour des concentrations de mannitol comprises entre 0,3 et 0,4 M. En milieu plus concentré, elle augmente légèrement ; par contre l'activité augmente très rapidement lorsque la concentration en mannitol diminue. Cependant, même pour une concentration en mannitol aussi faible que 0,025 M, elle reste encore inférieure à l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114 ; la lyse des lutoïdes n'est donc pas totale.

c) Effet d'une préincubation à 30 °C et à pH 5,0

Comme cela est illustré sur la figure 4, le fait de préincuber les lutoïdes à 30 °C et à pH 5,0, sans substrat, provoque une déstabilisation progressive des granules et la solubilisation de la phosphatase acide.

Cependant à cette température et à ce pH, les lutoïdes sont encore relativement stables, car au bout de 60 mn, l'activité libre bien qu'ayant augmenté de 5 fois environ n'est encore que de 37 % de l'activité totale mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114.

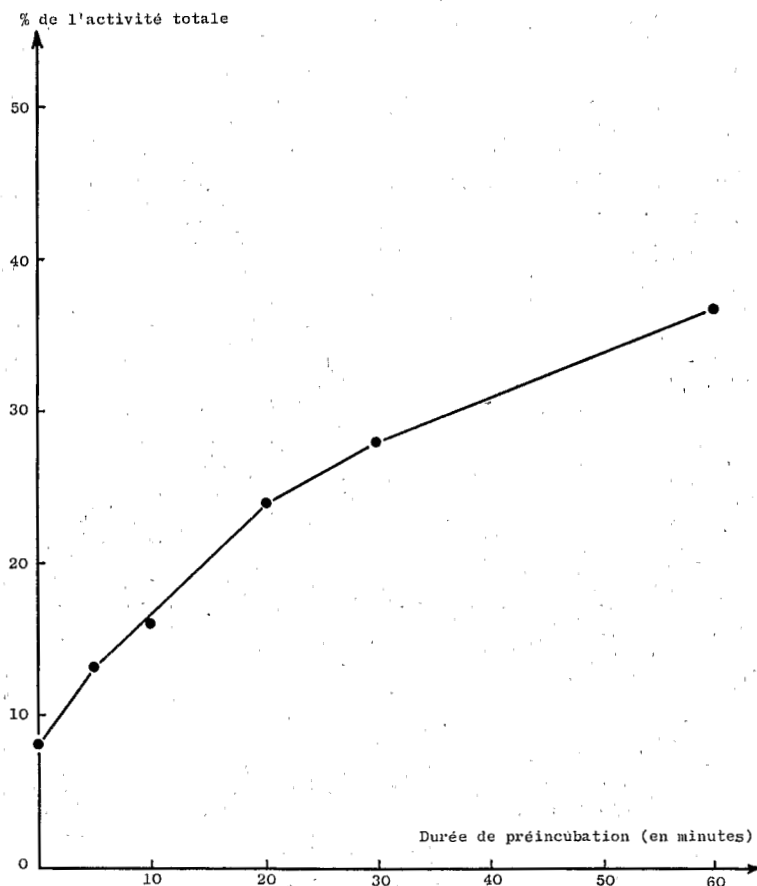


FIG. 4. — Action d'une préincubation à 30 °C et à pH 5,0 sur la libération de la phosphatase. Les lutoïdes ont été préincubés à 30 °C en milieu tampon acétate 0,1 M de pH 5,0 pendant des durées variables. Le substrat a ensuite été ajouté et après 10 mn, la réaction a été bloquée. Dans tous les cas, la concentration en mannitol du milieu était de 0,3 M. (Moyenne de 3 expériences).

III. — PROFIL DE SÉDIMENTATION DES HYDROLASES « LUTOÏDIQUES »

Dans le but de localiser les hydrolases, le latex a été centrifugé comme cela a été décrit précédemment. Il a ainsi été séparé d'une part la fraction lutoïde et d'autre

part le surnageant. Sur ces deux fractions, ainsi que sur le latex, on a mesuré les activités hydrolytiques et l'azote protéique. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I.

La récupération des activités enzymatiques est très satisfaisante dans l'ensemble. A noter cependant les valeurs un peu fortes pour la β -N-acétyl-glucosaminidase et la phosphodiesterase.

TABLEAU I
Distribution des hydrolases dans le latex

— L'azote protéique est exprimé en mg d'azote/ml de latex et les activités enzymatiques en μ M de produit libéré par minute et par ml de latex.

Enzymes	Latex	Surnageant		Lutoïdes		% de récupération p.r. à l'act. totale du latex
	Activité	Activité	% p.r. à l'act. tot. du latex	Activité	% p.r. à l'act. tot. du latex	
Azote protéique (27)*	1,78 ($\pm 0,25$)**	1,50 ($\pm 0,27$)**	84,3	0,24 ($\pm 0,06$)**	13,5	97,8
phosphatase libre (13)	0,61 ($\pm 0,20$)	0,75 ($\pm 0,13$)	21,6	0,53 ($\pm 0,19$)	15,2	36,7
phosphatase totale (13)	3,48 ($\pm 0,26$)	0,98 ($\pm 0,14$)	28,2	2,40 ($\pm 0,24$)	69,0	97,1
β -glucosidase libre (11)	0,33 ($\pm 0,17$)	0,52 ($\pm 0,17$)	31,5	0,24 ($\pm 0,09$)	14,5	46,1
β -glucosidase totale (11)	1,65 ($\pm 0,47$)	0,59 ($\pm 0,15$)	35,8	1,12 ($\pm 0,29$)	67,9	103,6
β -galactosidase totale (7)	0,069 ($\pm 0,005$)	0,053 ($\pm 0,015$)	76,8	0,018 ($\pm 0,005$)	26,1	102,9
β -N-acét. glucosaminidase tot. (7) .	0,046 ($\pm 0,011$)	0,018 ($\pm 0,013$)	39,1	0,037 ($\pm 0,005$)	80,4	119,6
phosphodiesterase totale (7)	0,137 ($\pm 0,019$)	0,057 ($\pm 0,024$)	41,6	0,103 ($\pm 0,024$)	75,2	116,8
cathepsine totale (4)	$22,8 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 8,2 \cdot 10^{-3}$)	$3,7 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 2,5 \cdot 10^{-3}$)	16,2	$19,4 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 5,7 \cdot 10^{-3}$)	85,1	101,3

* Nombre de mesures

** Intervalle de confiance pour $P = 0,05$

A partir des résultats du tableau I, on a représenté sur la figure 5 la distribution de ces enzymes par rapport aux fractions obtenues par centrifugation, selon le schéma préconisé par DE DUVE (1960). En abscisse il a été représenté le pourcentage d'azote protéique de chaque fraction et en ordonnée l'activité spécifique relative de l'enzyme, c'est-à-dire le rapport entre le pourcentage d'activité enzymatique et le pourcentage d'azote protéique de la fraction considérée.

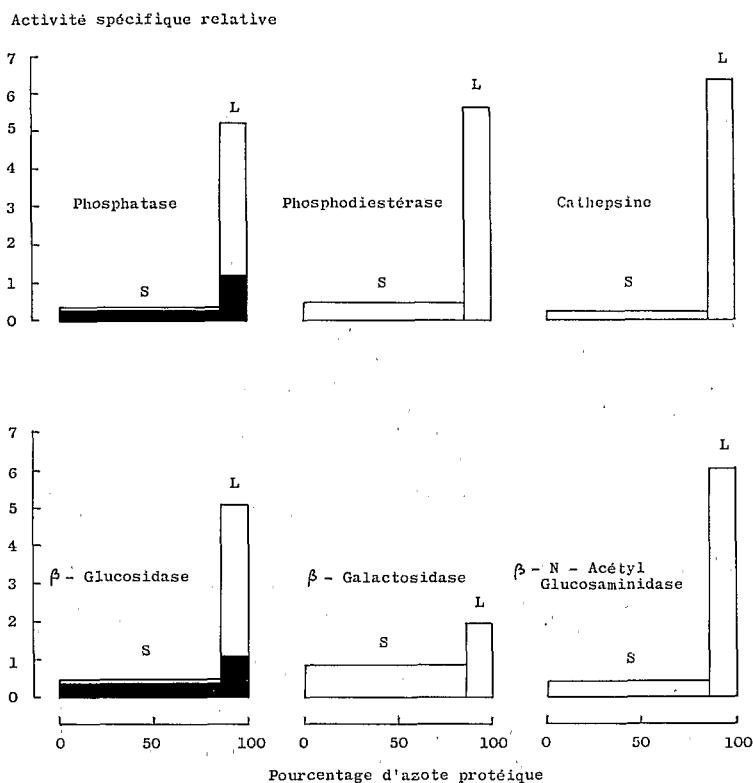


FIG. 5. — Distribution des hydrolases dans le surnageant et les lutoïdes. On a représenté, en abscisse, le pourcentage d'azote protéique contenu dans chaque fraction : S étant le surnageant et L la fraction lutoïdes ; en ordonnée, l'activité spécifique relative de l'enzyme, c'est-à-dire le rapport du pourcentage de l'activité totale de l'enzyme sur le pourcentage de l'azote protéique pour chacune des fractions considérées. Dans le cas de la phosphatase et de la β -glucosidase, on a représenté en noir les activités libres de l'enzyme.

Il est clair que les hydrolases étudiées sont toutes concentrées dans la fraction lutoïde et sont donc de nature particulière.

En ce qui concerne la phosphatase, la β -glucosidase, la β -N-acétyl-glucosaminidase, la phosphodiesterase et la cathepsine, la distribution est pratiquement identique, avec pour la cathepsine une activité spécifique relative légèrement plus importante dans la fraction lutoïde que pour les autres enzymes. Par contre, dans le cas de la β -galactosidase l'activité spécifique relative du surnageant est assez élevée, mais la distribution suit l'allure de celle des autres hydrolases. Il est probable que la répartition de la β -galactosidase est bimodale, ce qui expliquerait la forte activité trouvée dans le surnageant.

Dans le cas de la phosphatase et de la β -glucosidase qui, des hydrolases étudiées, sont les plus actives dans le latex, il a été possible de mesurer leur activité libre. On notera que dans les lutoïdes elle ne représente que 20 % de l'activité totale, c'est-à-dire qu'elle est en grande partie liée aux granules. Par contre, dans le surnageant elle représente plus de 80 % de l'activité totale, autrement dit ces enzymes sont pratiquement sous forme libre et proviendraient très vraisemblablement des lutoïdes

qui ont été lésés lors des manipulations. En outre, il est à noter que les rapports entre l'activité libre et l'activité totale dans le latex, le surnageant et les lutoïdes, qui sont respectivement de 0,18, 0,77 et 0,22 pour la phosphatase, de 0,20, 0,88 et 0,21 pour la β -glucosidase, sont du même ordre de grandeur dans chacune des suspensions considérées. Cela laisserait supposer une origine particulière identique de ces deux hydrolases.

Il est en effet essentiel de montrer l'origine particulière unique des hydrolases étudiées, car on peut mettre en doute la pureté de la fraction lutoïde et il est alors possible que ces enzymes proviennent de divers types de particules.

IV. — ACTION DE LA PRESSION OSMOTIQUE SUR LA LIBÉRATION SIMULTANÉE DES HYDROLASES

Les figures 6 et 7 illustrent la réaction des hydrolases libres à un changement de pression osmotique temporaire du milieu, la phosphatase acide ayant été prise comme enzyme témoin dans ces deux expériences.

Dans le cas d'une incubation courte de 10 mn, les courbes d'activation de la

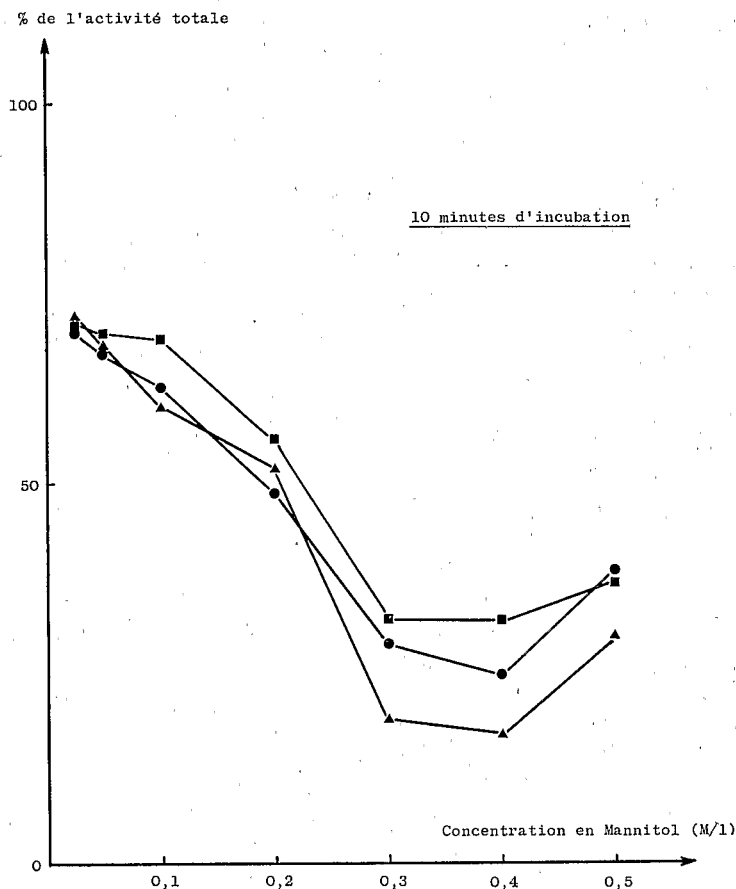


FIG. 6.

β -glucosidase et de la phosphodiesterase sont sensiblement identiques à celle de la phosphatase. Pour une concentration en mannitol inférieure à 0,3 M, l'activité augmente très rapidement; elle passe par un minimum entre 0,3 et 0,4 M, et augmente légèrement au-delà de 0,4 M de mannitol (fig. 6).

Par contre, dans le cas de la β -galactosidase et de la β -N-acétyl-glucosaminidase qui sont peu actives, il a fallu doubler la durée des incubations pour obtenir des résultats mesurables. Dans ces conditions les courbes d'activation de ces trois enzymes ne sont pas identiques (fig. 7). Ces différences doivent être dues à une dégra-

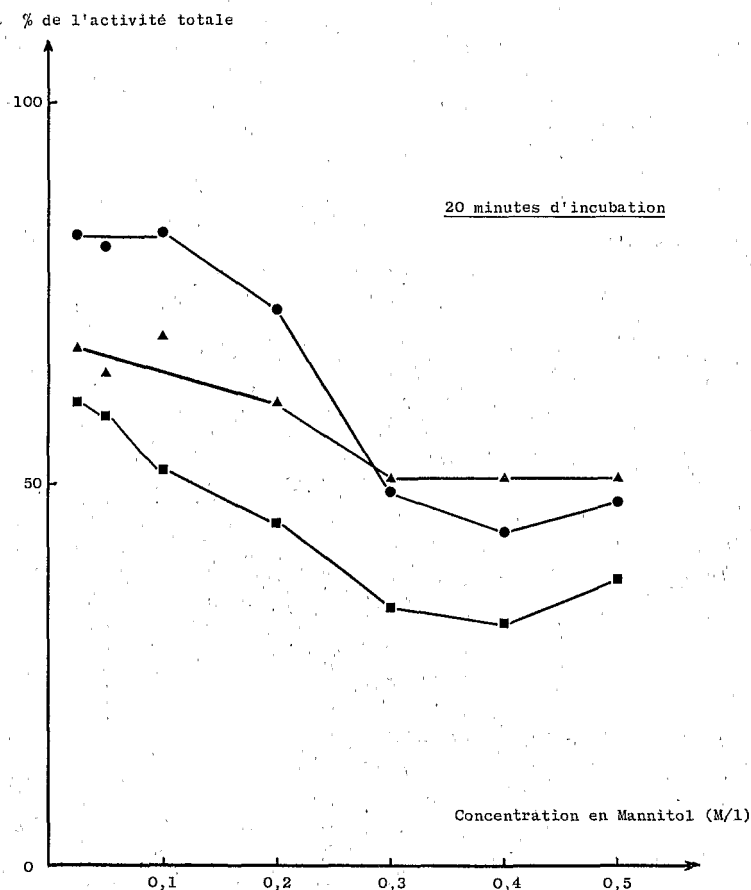


FIG. 7.

ci-contre

FIG. 6. — Action de la pression osmotique sur la libération simultanée de la phosphatase, la β -glucosidase et la phosphodiesterase des lutoïdes. Les lutoïdes ont été placés pendant 15 mn à 0 °C, dans des milieux de concentrations différentes en mannitol. Cette concentration ayant ensuite été ramenée à 0,3 M en mannitol, on a mesuré les activités des trois hydrolases : phosphatase acide (●); β -glucosidase (▲); phosphodiesterase (■). L'activité totale a été mesurée en présence de 0,1 % de Triton X-114. (Moyenne de 3 expériences).

ci-dessus

FIG. 7. — Action de la pression osmotique sur la libération simultanée de la phosphatase, la β -N-acétyl-glucosaminidase. Les conditions opératoires ont été les mêmes que celles de la figure 6, sauf que la durée d'incubation a été de 20 mn lors du dosage des hydrolases : phosphatase (●); β -galactosidase (▲); β -N-acétyl-glucosaminidase (■). (Moyenne de 3 expériences).

dation plus marquée des particules, provoquée par une incubation plus longue à 30 °C et à pH acide, ce qui a vraisemblablement amené des altérations dans la perméabilité de la membrane vis-à-vis des substrats utilisés. On constate cependant un certain parallélisme entre les trois courbes d'activation qui sont qualitativement du même type que celles de la figure 3, avec un minimum pour des concentrations en mannitol comprises entre 0,3 et 0,4 M.

V. — CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

On a cherché à résoudre le problème de la distribution des hydrolases en centrifugeant d'une part du latex et d'autre part des lutoïdes sur un gradient de densité linéaire obtenu à l'aide d'un mélange de mannitol 0,3 M et de saccharose à 50 % contenant du mannitol 0,3 M.

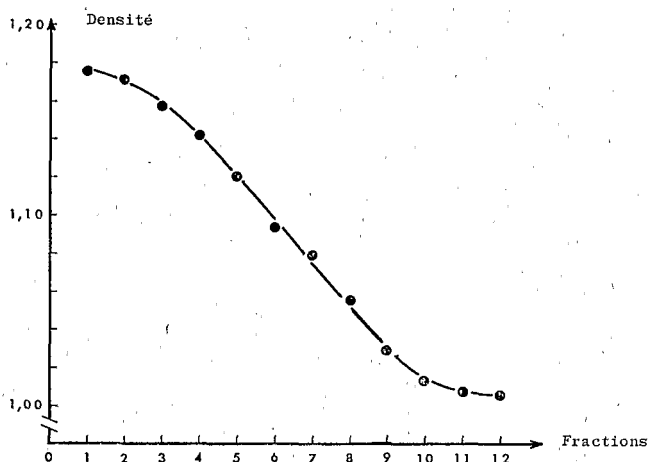
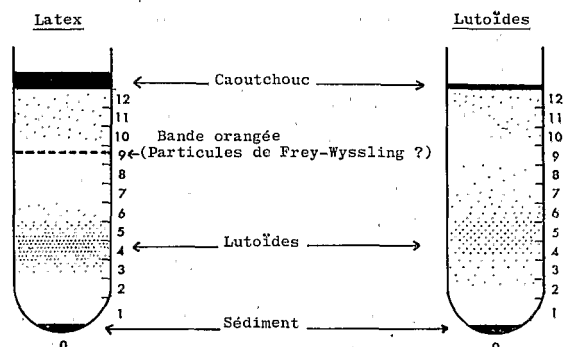


FIG. 8. — Aspects des tubes après centrifugation isopycnique du latex et des lutoïdes et densité des différentes fractions obtenues après percement du fond du tube.

Les figures 9 et 10 illustrent les résultats obtenus respectivement avec latex et lutoïdes. On a représenté en abscisse les fractions obtenues, la fraction zéro corres-

pendant au sédiment et la fraction 13 au caoutchouc dans le cas du latex ; en ordonnée le pourcentage de l'activité récupérée dans chacune des fractions. Dans ces conditions on obtient un histogramme représentant la distribution des hydrolases le long du gradient.

Dans le cas du latex (fig. 9) toutes les activités présentent un maximum très net à la fraction 4 correspondant dans ce cas à une densité de 1,14. D'un latex à

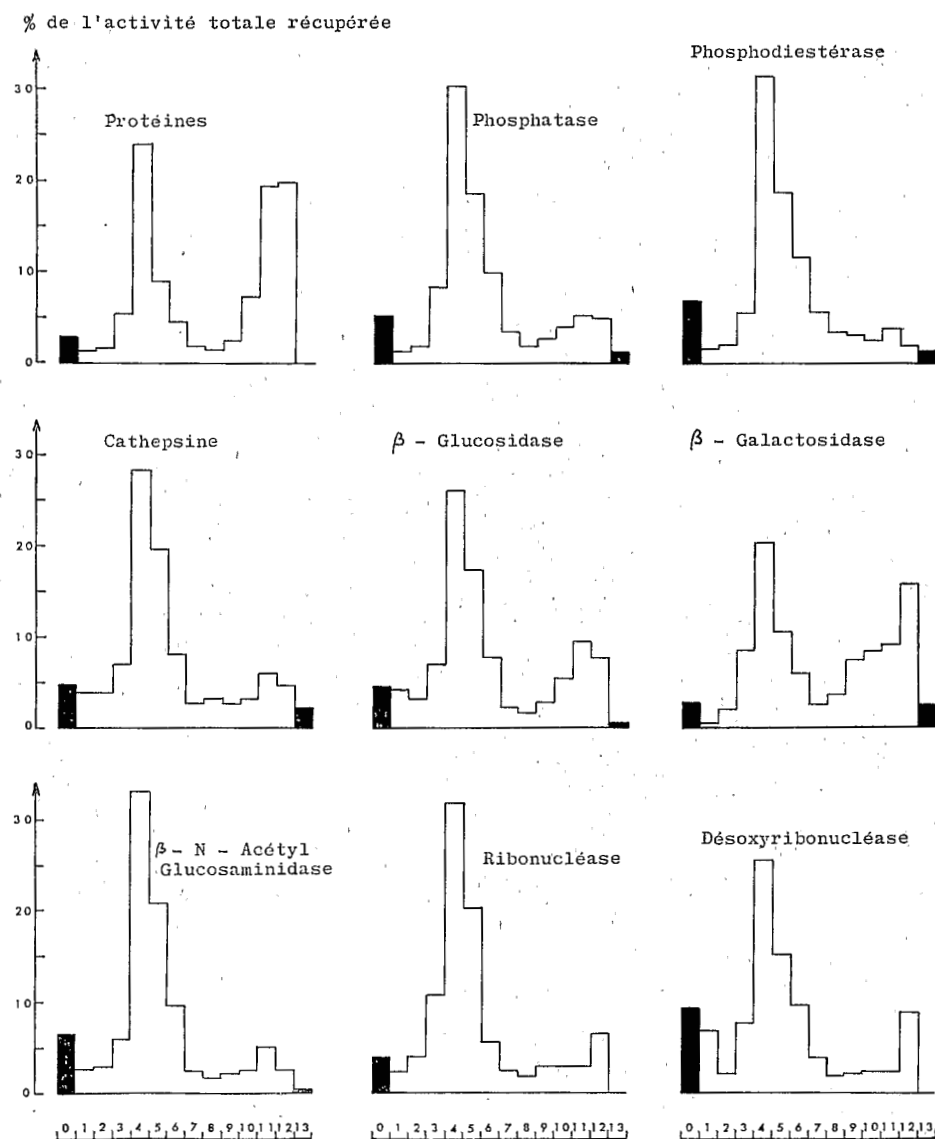


FIG. 9. — Distribution des hydrolases après centrifugation isopycnique du latex. En abscisse on a représenté le nombre de fractions et en ordonnée le pourcentage récupéré pour chaque fraction. La fraction zéro correspondant au sédiment et la fraction 13 au caoutchouc.

l'autre cette densité peut varier, mais les hydrolases étudiées suivent la même distribution que celle de la phosphatase acide. Cependant, comme cela avait déjà été noté précédemment, la β -galactosidase présente une distribution légèrement différente de celle des autres hydrolases. Le pic de la fraction 4 existe toujours, mais les activités des dernières fractions sont beaucoup plus importantes que dans le cas des autres hydrolases. Il semblerait donc qu'il existe deux β -galactosidases, l'une liée aux lutoïdes, l'autre soluble.

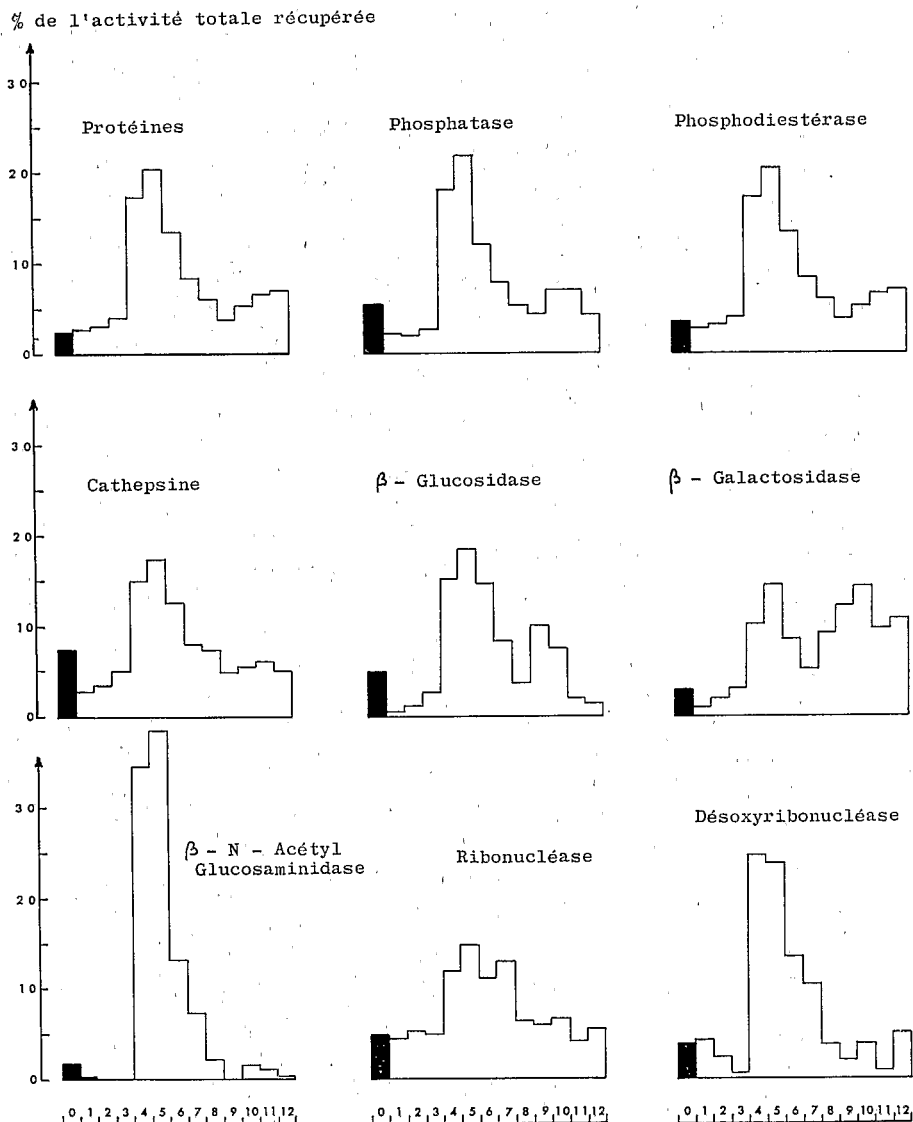


FIG. 10. — Distribution des hydrolases après centrifugation isopycnique des lutoïdes. Même représentation que celle de la figure 9.

On notera que dans le caoutchouc (fraction 13), les activités hydrolytiques pouvant être mesurées sont très faibles et pratiquement négligeables. Dans le cas de la ribonucléase et de la désoxyribonucléase pour lesquelles les activités sont difficilement mesurables en présence de grandes quantités de caoutchouc, il n'est pas possible de se prononcer.

En ce qui concerne les protéines, on retrouve le même maximum dans la fraction 4, mais il en existe une forte proportion dans les fractions 11 et 12 et certainement aussi dans le caoutchouc (fraction 13), où elles n'ont pas pu être dosées par colorimétrie. Cela confirme le fait que les lutoïdes sont les constituants particuliers les plus abondants du latex après le caoutchouc. Les autres granules ne peuvent être décelés par leur teneur en protéines, dans les conditions expérimentales actuelles, bien qu'à la hauteur de la fraction 9 il existe une bande orangée nettement visible, qui correspondrait vraisemblablement aux particules de Frey-Wyssling (cf. fig. 8).

Le cas du sédiment (fraction 0) restant au fond du tube pose un problème car il existe dans cette fraction une proportion non négligeable de protéines et d'hydrolases. On peut penser qu'elles font partie d'une seconde population de lutoïdes de densité plus forte, mais il est plus vraisemblable de supposer que ce sédiment est constitué par des particules agglutinées.

Lorsqu'une suspension de lutoïdes est soumise à une centrifugation isopycnique les résultats sont très proches de ceux obtenus avec le latex (cf. fig. 10). Cependant, on notera que la fraction où culminent les activités hydrolytiques est légèrement décalée et correspond à une densité de 1,12. En outre la dispersion des activités hydrolytiques est plus grande. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que lors de leur préparation, les lutoïdes ont été plus ou moins lésés ; les centrifugations et manipulations successives ont vraisemblablement amené un gonflement plus ou moins accentué des particules, ce qui a eu pour effet une légère diminution et une plus grande hétérogénéité de leur densité.

Enfin en ce qui concerne les protéines, on ne retrouve pas le fort pourcentage observé dans les trois dernières fractions dans le cas du latex. Cela est normal car elles représentent la fraction soluble de l'homogénat qui, dans le cas des lutoïdes, a été éliminée en grande partie lors de leur préparation par centrifugation différentielle.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'analyse des résultats décrits dans les paragraphes précédents montre que les lutoïdes sont des particules contenant un certain nombre d'hydrolases principalement du type acide.

Ces hydrolases sont faiblement réactives vis-à-vis de leurs substrats lorsque la particule est intacte. Par contre les enzymes passent dans la phase soluble et deviennent pleinement actifs dès que l'intégrité de la membrane est mise en cause. Divers traitements peuvent amener la lyse des lutoïdes, entre autres, la baisse de tonicité du milieu, la présence d'un détergent non-ionique ou la préincubation de ces particules à 30 °C et à pH 5,0. Dans le cas d'un changement temporaire de tonicité du milieu, on a pu observer que les hydrolases sont libérées d'une manière sensiblement parallèle. En outre par centrifugation isopycnique, il a pu être montré que ces enzymes sont groupés et présentent des distributions très semblables les unes des autres.

Ainsi, physiquement et chimiquement, les lutoïdes se comportent d'une manière analogue aux lysosomes. Ils renferment les principales hydrolases susceptibles d'attaquer les composés biologiques à haut poids moléculaire, et il est raisonnable de supposer que ces deux types de particules ont des fonctions similaires, c'est-à-dire de nature digestive. Cependant certaines hydrolases lysosomales comme la β -glucuronidase et l'aryl-sulfatase n'ont pas pu être caractérisées dans les lutoïdes, alors qu'elles semblent exister dans les sphérosomes qui seraient les équivalents des lysosomes dans la cellule végétale (OLZEWSKA et GABARA, 1964).

En fait, les principales différences entre lutoïdes et lysosomes résident dans quelques-uns de leurs caractères physiques.

D'une part la densité des lutoïdes, bien que variable d'un latex à l'autre, semble toujours plus faible que celle des lysosomes hépatiques qui est de 1,22 environ (BEAUFAY et *al.*, 1959a), mais serait assez proche de celle des sphérosomes ($d = 1,11$) et des prosphérosomes ($d = 1,14$) décrits dans les feuilles de Tabac et de Maïs (MATILE et *al.*, 1965), ce qui semblerait traduire une certaine richesse des lutoïdes en lipides.

D'autre part la taille des lutoïdes est très supérieure à celle des lysosomes qui ont un diamètre de 0,3 à 0,4 μ (NOVIKOFF et *al.*, 1956) alors que celle des lutoïdes peut quelquefois atteindre 10 μ (SOUTHORN, 1960). Par contre leur structure est semblable, ces organites étant limités par une membrane simple.

Ainsi, s'il existe des différences mineures entre les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* et les lysosomes de la cellule animale, ces deux types de particules ont de nombreux caractères communs. On peut en définitive considérer que les lutoïdes appartiennent à la famille des lysosomes et il est possible que de par leur taille, ils soient en fait des vacuoles digestives, quoiqu'on n'ait encore jamais observé de structures en voie de digestion dans ces particules.

Un des rôles connus les plus intéressants des lysosomes est celui de leur intervention dans les phénomènes d'autolyse et de nécrose au sein de la cellule, ainsi que de leurs réactions aux traumatismes (DE DUVE et WATTIAUX, 1966). L'étude de ce dernier caractère peut présenter un intérêt certain dans le domaine de l'Hévéa.

Le fait de saigner de façon bihebdomadaire un arbre constitue un traumatisme répété, et cela expliquerait peut-être la grande richesse du latex en lutoïdes. Cependant, il semble qu'à la longue, l'arbre s'habitue à ce traumatisme. En effet, si lors de l'ouverture d'un panneau de saignée sur un Hévéa, le latex ainsi que les lutoïdes sont très instables et coagulent rapidement, donnant une faible production en caoutchouc, petit à petit cette production augmente, vraisemblablement par suite d'une stabilisation des lutoïdes. Il est donc essentiel que ces particules restent stables malgré ces traumatismes répétés, car on conçoit aisément que la libération des hydrolases dans la cellule laticifère puisse devenir rapidement un facteur limitant de la production. Il a déjà pu être mis en évidence une corrélation directe entre la stabilité des lutoïdes et la capacité du latex à transformer l'acétate 2- 14 C en caoutchouc radioactif *in vitro* (PUJARNISCLE et RIBAILLIER, 1966). En outre, il a été montré que l'arrêt de l'écoulement du latex serait dû à l'agglutination des lutoïdes (PAKIANATHAN et *al.*, 1966) et que la coagulation du caoutchouc serait en grande partie provoquée par l'action d'une phospholipase qui serait vraisemblablement d'origine lutoïdique (SOUTHORN, 1966). Cette phospholipase attaquerait la couche lipoprotéique des particules de caoutchouc et entraînerait une coagulation rapide du latex.

Enfin certains accidents physiologiques de saignée, connus sous le nom de *Brown-Bast disease* (COMPAGNON et *al.*, 1953) présentent de grandes analogies avec

les nécroses tissulaires provoquées par une déstabilisation des lysosomes (BEAUFAY et *al.*, 1959 *b*). Ces accidents, qui présentent à leur début une coagulation partielle ou totale du latex sur l'encoche de saignée, peuvent aller jusqu'à la nécrose et à l'éclatement de l'écorce aux alentours du panneau de saignée. Ce sont en général les arbres les plus hauts producteurs ou ceux soumis à une exploitation trop intensive qui sont les plus susceptibles à ces accidents. Par analogie avec les lysosomes, on est en droit de penser que les lutoïdes puissent jouer un rôle dans ces processus nécrotiques.

La déstabilisation des lutoïdes ne serait sans doute que la conséquence de troubles physiologiques. Un déséquilibre organique ou minéral, et notamment l'excès de certains cations (Mg^{++} , Ca^{++} , etc.), comme dans le cas des lysosomes (TAPPEL et *al.*, 1963), pourrait entraîner cette déstabilisation.

REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être réalisé grâce au concours de D. RIBAILLIER de l'Institut des Recherches sur le Caoutchouc en Afrique, qui a sélectionné les arbres et fourni le latex nécessaire à cette étude ; aux conseils et encouragements de C. LIORET, Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay, et de J. d'AUZAC de l'Institut Français du Caoutchouc.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREWS E.H. et DICKENSON P.B., 1960. — Preliminary electron microscope observations on the ultra-structure of the latex Vessel and its contents in young tissues of *Hevea brasiliensis*. *Proc. Nat. Rubb. Res. Conf.*, Kuala Lumpur, R.R.I. of Malaya, 756-765.
- ARCHER B.L., AUDLEY B.G., COCKBAIN E.G. et MCSWEENEY G.P., 1963. — The biosynthesis of rubber. *Biochem. J.*, **89**, 565-574.
- ARCHER B.L. et McMULLEN A.J., 1960. — Some recent studies of the non-rubber constituents of natural rubber latex. *Proc. Nat. Rubb. Res. Conf. Kuala-Lumpur.*, R.R.I. of Malaya, Kuala-Lumpur, 787-795.
- BANDURSKI R.S. et TEAS H.J., 1957. — Rubber biosynthesis in latex of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol.*, **32**, 643-648.
- BEAUFAY H., BENDALL D.S., BAUDHUIN P., WATTIAUX R. et DE DUVE C., 1959a. — Tissue fractionation studies. 13) Analysis of mitochondrial fractions from rat liver by density-gradient centrifuging. *Biochem. J.*, **73**, 628-637.
- BEAUFAY H., Van CAMPENHOUT E. et DE DUVE C., 1959b. — Tissue fractionation studies. 11) Influence of different hepatotoxic treatments on the state of some bound enzymes in rat liver. *Biochem. J.*, **72**, 617-623.
- BEAUFAY H., JACQUES P., BAUDHUIN P., SELLINGER Z.O., BERTHET J. et DE DUVE C., 1964. — Tissue fractionation studies. 18) Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *Biochem. J.*, **92**, 184-205.
- COCKBAIN E.G. et SOUTHERN W.A., 1962. — The structure and composition of Hevea latex. *Rev. gén. Caoutch.*, **39**, 1149-1156.
- COMPAGNON P., TIXIER P. et ROUJANSKY G., 1953. — Contribution à l'étude des accidents physiologiques de saignée. *Arch. Rubb. cult., Extra number*, 54-69.
- CONCHIE J. et LEVY G.A., 1957. — Inhibition of glycosidases by aldono-lactones of corresponding configuration. *Biochem. J.*, **65**, 389-395.
- DICKENSON P.B., 1964. — The ultrastructure of latex vessel of *Hevea brasiliensis*. *Proc. Nat. Rubb. Producer's Res. Ass., Jubilee Conf.*, Cambridge, McLAREN and SON, Londres, 52-56.
- DE DUVE C., 1959. — Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. In *Subcellular particles*. T. Hayashi éd., The Ronald Press Company, New York, 128-159.

- DE DUVE C., 1960. — La localisation des enzymes dans les éléments figurés des cellules. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **42**, 11-29.
- DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. et APPELMANS F., 1955. — Tissue fraction studies. 6) Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, **60**, 604-617.
- DE DUVE C. et WATTIAUX R., 1966. — Function of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.*, **28**, 435-492.
- FREY-WYSSLING A., 1929. — Microscopisch onderzoek naar het voorkomen van harsen in de latex van Hevea. *Arch. Rubbercult.*, **13**, 394-434.
- HOMANS L.N.S. et Van GILS G.E., 1948. — Fresh Hevea latex. A complex colloidal system. *Proc. Sd Rubb. Technol. Conf.*, Londres, 292-302.
- LINHARDT K. et WALTER K., 1963. — Phosphatases : Determination in serum with p-nitrophenyl phosphate. In *Methods of Enzymatic analysis*, H.U. Bergmeyer éd., Academic Press, New York et Londres, 783-785.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. — Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MATILE Ph., BALZ J.P., SEMADENI E. et JOST M., 1965. — Isolation of sperosomes with lysosomes characteristics from seedling. *Z. Naturforsch.*, **20**, 693-698.
- NOVIKOFF A.B., BEAUFAY H. et DE DUVE C., 1956. — Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat-liver. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **2**, 179-184.
- OLSEWSKA M.J. et GABARA B., 1964. — Recherches cytochimiques sur la présence de certaines hydrolases au cours de la cytotinèse chez les plantes supérieures. *Protoplasma*, **59**, 163-179.
- PAKIANATHAN S.W., BOATMAN S.G. et TAYSUM D.H., 1966. — Particle aggregation following dilution of Hevea latex : A possible mechanism for the closure of latex vessels after tapping. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, **19**, 259-271.
- PUJARNISCLE S., 1965. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* : Analogie avec les lysosomes. *C.R. Acad. Sc.*, **261**, 2127-2130.
- PUJARNISCLE S., 1966. — Etude préliminaire sur l'activité enzymatique des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* : Distribution de la phosphatase acide, de la β -glucosidase et de la cathepsine dans le latex. *C.R. Acad. Sc.*, **262**, 923-925.
- PUJARNISCLE S. et RIBAILLIER D., 1966. — Etude préliminaire sur les lutoïdes du latex et leur possibilité d'intervention dans la biosynthèse du caoutchouc. *Rev. gén. Caoutch. Plast.*, **43**, 226-228.
- RUINEN J., 1950. — Microscopy of the lutoïds in Hevea latex. *Ann. Bogoriensis*, **1**, 27-45.
- SINSHEIMER R.L. et KÖRNER J.F., 1952. — A purification of venon phosphodiesterase. *J. biol. Chem.*, **198**, 293-296.
- SOUTHOORN W.A., 1960. — Microscopy of Hevea latex. *Proc. Nat. Rubb. Res. Conf.*, Kuala-Lumpur, R.R.I. of Malaya, Kuala-Lumpur, 766-776.
- SOUTHOORN W.A., 1966. — Communication privée.
- TAPPEL A.L., SAWANT P.L. et SHIBKO S., 1963. — Lysosomes : Distribution in animals ; hydrolytic capacities and other properties. In *Lysosomes. Ciba found. Symp.*, A.V.S. De Reuck et M.P. Cameron éd., J.A. Churchill, Londres, 78-113.
- UMBREIT W.W., BURRIS R.H. et STAUFFER J.F., 1957. — *Manometric Techniques*. Burgess publ., Minneapolis, 274.
- WATTIAUX R. et DE DUVE C., 1956. — Tissue fractionation studies. 7) Release of bound hydrolases by means of Triton X-100. *Biochem. J.*, **63**, 606-608.